

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 12 July 1999 (12.07.99)	
International application No. PCT/EP98/06210	Applicant's or agent's file reference P 11 PCT
International filing date (day/month/year) 30 September 1998 (30.09.98)	Priority date (day/month/year) 04 October 1997 (04.10.97)
Applicant EIKMANN, Bernd et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

24 April 1999 (24.04.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jean-Marie McAdams Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[TRANSLATION]

DESCRIPTION

METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

Field of the Invention

The invention relates to a method of microbial production of amino acids of the aspartate family and/or of the glutamate family according to claims 1 to 17, to the pyruvate-carboxylase gene according to claims 18 to 23, gene structures according to claim 24, vectors according to claim 25, transformed cells containing the pyruvate-carboxylase gene according to claims 26 to 31 as well as to uses according to claims 32 to 37.

Background of the Invention

Amino acids are of considerable economic interest since amino acids have many uses: thus, for example, L-lysine and L-threonine, L-methionine and L-tryptophan are necessary as fodder additives, L-glutamate as an additive to suppress L-isoleucine and L-tyrosine in the pharmaceutical industry, L-arginine and L-isoleucine as medicaments or L-glutamate, L-aspartate and L-phenylalanine as starting substances for the synthesis of fine chemicals.

A preferred method of producing these different amino acids is the biotechnical production by means of microorganisms such that in this manner the biologically-effective and optically-active forms of the respective amino acids are obtained and simple

- 1 -

feedback-resistant prephenate dehydrogenase is described (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

In addition, by overexpression of genes which do not code for feedback-sensitive enzymes in amino acid synthesis, increased amino acid yields are obtainable. Thus, for example, L-lysine formation can be improved by increased synthesis of the dihydrodipicolinate synthesis (EP 0 197 335). Increasingly, by increased synthesis of the threoninedehydrogenase, improved isoleucine formation is achieved (EP 0 436 886).

Further investigations in increasing amino acid production have been targeted on the improved availability of the cellular primary metabolites of central metabolism. Thus it is known that, by recombinant techniques, over-expression of the transketolase can bring about an improved product formation of L-tryptophan or L-tyrosine or L-phenylalanine (EP 0 600 463). Furthermore, the reduction of the phosphoenolpyruvate-carboxylase activity in *Corynebacterium* leads to improved formation of aromatic amino acids (EP 0 3331 145) whereas by contrast the increase in the phosphoenolpyruvate-carboxylase activity in *Corynebacterium* leads to increased (recovery) of amino acids of the aspartate family (EP 0 358 940).

During the growth and especially under amino acid production conditions, the tricarboxylic acid cycle must continuously and effectively be supplemented with C4 compounds, for example, oxalic acetate to replace intermediate products withdrawn for the amino acid biosynthesis. Until recently it has been

- 3 -

and inexpensive raw materials can be used. As microorganisms, for example, *Corynebacterium glutamicum* and its derivatives *ssp. Flavum* and *ssp. Lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 to 260) in addition to *Escherichia coli* and related bacteria are used. These bacteria normally produce the amino acids but only in amounts required for growth so that no surplus amino acids are formed and can be recovered. This is because in the cells the biosynthesis of amino acids is controlled in many ways.

As a consequence, there are already known various processes to increase the product formation by cutting out the control mechanisms. In these processes, for example, amino acid analogs are introduced to switch off the effective regulation of the biosynthesis. For example, a process has been used which is resistant to L-tyrosine analogs and L-phenylalanine analogs (JP 19037/1976 and 39517/1978). The processes also have been described in which bacteria resistant to L-lysine analogs or L-phenylalanine analogs have been used to suppress the control mechanisms (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Furthermore, microorganisms which have been constructed also by recombinant DNA-technique which also obviate regulation of biosynthesis in that the gene which is coded in the no-longer feedback-inhibited key enzyme is cloned and expressed. For example, the recombinant L-lysine-producing bacterium with plasmid-coded feedback-resistant aspartate kinase is known (EP 0 381 527). In addition, a recombinant L-phenylalanine-producing bacterium with

- 2 -

thought that phosphoenolpyruvate-carboxylase was responsible for these so-called anaplerotic functions in *Corynebacterium* (Kinoshita, Biology of Industrial Micro-organisms 1985: 115 to 142, Benjamin/Cummings Publishing Company, London; Liebl, The Prokaryotes II, 1991 to 1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino and Stephanopoulos, Biotechnol Bioeng 1993, 41: 633 to 646).

It has, however, now been found that phosphoenolpyruvate-carboxylase-negative mutants grow equally by comparison to the respective starting strains on all media (Peters-Wendisch et al., FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269 to 274; Gubler et al., Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857 to 863). These results indicate that the phosphoenolpyruvate-carboxylase is not essential for the growth and plays no role or only a small role for the anaplerotic reactions. Furthermore the aforementioned results indicate that in *Corynebacterium* another enzyme must be provided which is responsible for the synthesis of oxalacetate which is required for the growth. Recently, indeed, a pyruvate-carboxylase activity has been found in permeabilized cells of *Corynebacterium glutamicum* (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 to 1103). This enzyme is effectively inhibited by AMP, ADP and acetyl coenzyme A and in the presence of lactate as a carbon source is formed in increased quantities. Since one must conclude that this enzyme is answerable primarily for the satisfaction of the tricarboxylic acid cycle of growth, it was to be expected that an increase in the gene expression or the enzymatic activity would either give rise to no increase in the amino acids belonging to the

- 4 -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aspartate or yield only an increase therein. Furthermore, it was to be expected that an increase in the gene expression or the enzymatic activity of the pyruvate-carboxylase would also have no influence on the production of amino acids of other families.

It has surprisingly been found that an increase in the pyruvate-carboxylase activity by genetic modification of the enzyme and/or by increasing the pyruvate-carboxylase gene expression, the microbial production of amino acids of the aspartate and/or the glutamate families can be increased. It has been found that especially strains with increased copy numbers of the pyruvate-carboxylase gene can produce about 50% more lysine, 40% more threonine and 150% more homoserine in the culture medium. It has been found further that, surprisingly, the glutamate production is also significantly increased (compare especially the example under 6. Table 4).

The genetic alteration of the pyruvate-carboxylase to increase the enzyme activity is effected preferably by mutation of the endogenous gene. Such mutation can either be achieved by classical methods like, for example, by UV irradiation or by mutation triggering the chemicals or targeted by means of gene technological methods like deletion, insertion and/or nucleotide exchange.

The pyruvate-carboxylase gene expression is increased by increasing the gene copy number and/or by reinforcing regulatory factors which positively influence the expression of the gene. Thus a reinforcement of regulatory elements, preferably on the

- 5 -

transcription plane can be effected in that especially the transcription signals are increased. This can be effected, for example, by varying the promoter sequence of the promoter preceding the structure gene to enhance its effectiveness or by replacing the promoter completely by more effective promoters. A reinforcement of the transcription can also be effected by a corresponding influence on a regulator gene associated with the pyruvate-carboxylase gene. This can be achieved, for example, by mutation of a regulatory gene sequence to influence the effectivity of the binding of a regulator protein to the DNA of the pyruvate-carboxylase gene which is regulated so that the transcription is thereby enhanced and thus the gene expression is increased. Furthermore the pyruvate-carboxylase gene can also be associated with a so-called "enhancer" as a regulatory sequence and which by means of an improved interchange between RNA polymerase and DNA also effects an increased pyruvate-carboxylase gene expression. However, a reinforcement of translations is also possible in that, for example, the stability of the m-RNA is improved.

For increasing the gene copy number the pyruvate-carboxylase gene is built into a gene construct or vector. The gene construct contains especially the regulatory sequences associated with the pyruvate-carboxylase gene, preferably those which reinforce the gene expression. For the incorporation of the pyruvate-carboxylase gene in a gene construct, the gene is progressively isolated from a microorganism strain of the *Corynebacterium* variety and is transformed in an amino-acid

- 6 -

producing microorganism strain, especially *Corynebacterium* or in *Escherichia coli* or *Serratia marcescens*. For the process of the invention, especially genes from *C. glutamicum* or *C. glutamicum* ssp. *flavum* or *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* are suitable.

After isolation of the gene and in the in vitro recombination with known vectors (see for example Simon et al., Bio/Technology 1983, 1: 784 to 791; Eikmanns et al., Gene 1991, 102: 93 to 98), the transformation is effected in the amino-acid producing strain by electroporation (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 1991, 65: 299 to 304) or conjugation (Schäfer et al., J. Bacteriol 1990, 172: 1663 to 1666).

As the host strain preferably such amino-acid producers are used which have been deregulated in the synthesis of the corresponding amino acid and/or show an increased export carrier activity for the corresponding amino acid. Furthermore, such strains are preferred which contain an increased number of such central metabolism metabolites as anticipated in the synthesis of the corresponding amino acid and/or strains which contain a reduced proportion of the central metabolism metabolites which do not participate in the synthesis of the corresponding amino acid, especially metabolites which tolerate competitive reactions; i.e. such strains are preferred which synthesis paths competitive with the corresponding amino acid biosynthesis path run with reduced activity. Thus, especially a *Coryne-former* microorganism strain with reduced citrate synthase activity is

- 7 -

suitable as a strain resistant to L-asparaginic-acid- β -methyl ester (AME) (is-suitable) (EP 0 551 614).

After isolation, the pyruvate-carboxylase gene is obtained with nucleotide sequences which code for the amino acid sequence given under SEQ ID No. 2 or their allele variations or the nucleotide sequence of nucleotides 165 to 3587 according to SEQ ID No. 1 or a substantially identically-effective DNA sequence. The gene further contains a protein promoter of the nucleotide sequence of nucleotides 20 to 109 according to SEQ ID No. 1, a substantially identically effective DNA sequence. Allele variations or identically effective DNA sequences encompass especially functional derivations which are corresponding nucleotide sequences formed by deletions, insertions and/or substitutions of nucleotides whereby the enzyme activity or function remains or can even be increased. This pyruvate-carboxylase gene is preferably used in the process of the invention.

The pyruvate-carboxylase gene with or without the preceding promoter or with or without the associated regulator gene can be preceded by and/or followed by one or more DNA sequences so that the gene is contained in a gene structure.

The pyruvate-carboxylase gene is preferably preceded by the tac-promoter (*lacI*⁻-Gen) which is associated especially with regulatory sequences.

By cloning the pyruvate-carboxylase gene, plasmids are obtained which contain the gene and are suitable for transformation to an amino acid producer. The cells obtained by transformation

- 8 -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

which preferably correspond to transformed cells of *Corynebacterium*, contain the gene in replicatable form, i.e. in additional copies on the chromosome, whereby the gene copies are integrated by recombination at optional sites in the genome and/or

on a plasmid or vector. *Brief Description of the Drawings*

Figure 1 is a physical map and restriction analysis of the cloned pyruvate carboxylase encoding gene from *C. glutamicum* ATCC 13032. In pUC18 resulting in the vector pUCpyc.

Example

1. Cloning the Pyruvate-Carboxylase Gene of *Corynebacterium Glutamicum*

Starting from conserved regions of all prior known pyruvate-carboxylase (pyc-) genes of *Saccharomyces cerevisiae* (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochem Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), Aedes aegypti (EMBL-GeneBank: Accession Nr. L36530) and from *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GeneBank: Accession Nr. U00024), PCR primer is synthesized (MWG Biotech). The primer corresponds to the bases 810 to 831 and 1015 to 1037 of the pyc gene from *M. tuberculosis*. With this primer, by means of PCR according to the standard method of Innis et al (PCR protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) for nongenerated homologous primer, a fragment of about 200 bp of chromosomal DNA of *C. glutamicum* ATCC 13032 as has been described by Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) is isolated following amplification. The size of 200 bp corresponds to the expectation for the pyc gene. The PCR product as described by Sanger et al (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74:

Figure 2 is a physical map of the expression vector pVWEX1 containing the pyruvate carboxylase encoding gene from *C. glutamicum* 13032. Abbreviations: pyc = pyruvate carboxylase, *P_{trc}*-IPTG = inducible synthetic promoter of *trp* (-35 box) and *lac*-promoter (-70 box) regions; *lacIq* = gene encoding the repressor of the operon, *kan* = gene encoding the resistance to kanamycin.

5463-5467) was sequenced. The sequencing was carried out with fluorescence-marked ddNTPs with an automatic DNA sequencing apparatus (Applied Biosystems).

Starting from this DNA fragment of *C. glutamicum*, the following homologous oligonucleotides are produced:

pyc 1 5'- CGTCTTCATCGAATGAAC-3' SEQ ID NO:3

pyc 2 5'- ACGGTGGTGATCCGGCACT-3' SEQ ID NO:4

The oligonucleotide is used as a PCR primer for isolating the probe for the gene of pyruvate-carboxylase (pyc) from *C. glutamicum*. The primer is introduced into a PCR reaction with chromosomal DNA from *C. glutamicum* and digoxigenine-marked nucleotides. The reaction is carried out in accordance with the instructions of the "PCR DIG Labeling Kits" of the firm Boehringer Mannheim. With this approach, a digoxigenine-marked DNA fragment is amplified which corresponds to the expected size of about 200 bp. The thus produced pyc probe is then used to identify, utilizing Southern-blot-hybridization, a DNA fragment in the chromosomal DNA of *C. glutamicum* on which the pyc gene is localized. For this purpose each 2 to 5 µg of chromosomal DNA from *C. glutamicum* WT is cleaved with the restriction enzyme HindIII, SphI, SalI, DdraI, EcoRI and BamHI and the obtained DNA fragments are correspondingly separated by size over 16 hours at 20 volts gel-electrophoretically in an 0.8% agarose gel. The DNA fragments found in the agarose gel are denatured by the Southern blot (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) and subjected to the vacuum-supported separation with the VacuGene Blot Apparatus of Pharmacia LKB

- 10 -

(Uppsala, Sweden) from the gene matrix transferred onto a nylon membrane (Nytran N13 of Schleicher and Schüll, Dassel, Switzerland), immobilized and the digoxigenine marker detected by means of NBT/X phosphate conversion with alkali phosphatases in this manner. Following chromosomal fragments hybridized with the pyc-DNA-probe can be detected: a 17 kb HindIII-fragment, a 6.5 kb SalI fragment and a 1.35 kb EcoRI fragment.

The 17 kb HindIII fragment was isolated and subcloned. For this purpose a cosmid gene bank of chromosomal DNA from *C. glutamicum* in cosmid pH C79 was used which represented the genome of *C. glutamicum* to 99% (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). The *E. coli* strain DH5α was transformed with this gene bank by means of the CaCl₂ method of Sambrook et al (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and plated out to about 300 colonies per LB-agar plate with 50 µg/l kanamycin (a total of 5000 colonies). Then the obtained transformed product was transferred on a nytran N13 filter and incubated for 5 minutes for alkali lysis of the cells and denaturing of the DNA on Whatmann paper soaked with 0.5 M NaOH and 1.5 M NaCl. The subsequent neutralization is effected with 1 M Tris/HCl pH 7.5 and 1.5 M NaCl. The subsequent neutralization is effected with 1 M Tris/HCl pH 7.5 and 1.5 M NaCl.

After incubation of the filter in 2 x SSC, the liberated DNA is fixed by UV radiation at 366 nm on the filter. Then the remaining cell fragments are removed by shaking in 3 x SSC, 0.1% SDS at 50°C. The filter in this form is used for the hybridiza-

tion with a specific pyc probe as described by Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517).

The 3 transformands were identified from the pyc probe hybridization. From these transformands the cosmid DNA was isolated by means of plasmid proportion in accordance with the alkali lysis method of Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) and then tested by restriction and Southern blot analysis for the presence of the HINDIII fragments. The cosmid pH C79-10 which contains a 40 kb HINDIII transmission completely and was further analyzed. It showed that also after the restriction with the endonucleosid SalI and EcoRI the same hybridized fragments as in the chromosomal DNA, i.e. a 6.5 kb SalI- fragment and a 1.35 kb EcoRI-fragment. The 17 kb HindIII-fragment was isolated by restriction from the cosmid and is ligated in the *E. coli* vector pUC 18, which is also cleaved with HindIII. A restriction analysis of the fragments in the resulting vector pUC pyc was carried out. The physical mapping of the fragments is shown in FIG. 1.

2. Sequencing of the Pyruvate-Carboxylase Gene

In further subcloning steps a 0.85 kb SalI-EcoRI-fragment was isolated from the plasmid pUC pyc by restriction with corresponding restriction enzymes as a 1.35 kb EcoRI-fragment, a 1.6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-fragment as well as a 1.6 kb ClaI-fragment, that overlapped with 0.85 kb SalI-EcoRI-fragment. By ligation the fragments were cloned correspondingly in the restricting vector pUC 18 and then sequenced as described above according to Sanger et al.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) the nucleotide sequences obtained were analyzed. The program package HUSAR (Release 3.0) of the German zone for cancer research (Heidelberg). The sequence analysis of the fragments gave a continuously open reading raster of 3576 bp which coded for a protein sequence of 1140 amino acids. Comparison of the protein sequence with the EMBL gene data bank (Heidelberg) gave similarities to all known pyruvate carboxylases. The highest identity (62%) was to the putative Pyruvate-carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL- GeneBank: Accession No. U00024). The similarity amounted to 76% when conserved amino acid exchange was followed. A comparison with the pyruvate-carboxylase of other organisms yielded an identity of 46 to 47% identical and 64 to 65% similar amino acids (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL- GenBank: Accession No. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315). From these results it could be concluded that the cloned fraction base was the gene for the Pyruvate-carboxylase from *C. glutamicum*. The nucleotide sequence of the gene is given under SEQ ID No. 1 and the corresponding amino acid sequence under SEQ ID No. 2.

3. Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase

For the overexpression of the gene for pyruvate-carboxylase from *C. glutamicum*, the gene was cloned from the plasmid pUCpyc as the 6.2 kb SspI-ScaI-fragment in the *E. coli*

- 13 -

glutamicum swing vector pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) which was cleaved with the restriction endonucleosis EcoRI and PstI. By means of Klenow-polymerase treatment the overhanging ends were ligated to smooth ends by filling the EcoRI or linking PstI and the linearized vector was ligated with the 6.2 kb SspI-ScaI-fragment. The resulting construct pEK0pyc was additionally transformed in the *E. coli* strain DH5 α , the plasmid DNA was isolated on the resulting transformand and the correctness of the inserts controlled by restriction. The DNA was then introduced in the strain SP 733 by electroporation (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304).

This strain is a mutant of the restriction negative *C. glutamicum* strain R 127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie) which was obtained by chemical mutagenesis and was characterized in that it cannot be grown on a minimal medium with pyruvate and lactate as single carbon sources (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). This phenotype is recognized as a defect in the pyruvate-carboxylase and can be complemented by introducing the pyruvate-carboxylase gene from *C. glutamicum*, i.e. the strain which is carried by the plasmid pEK0pyc and was by contrast to the starting strain able to grow again in the presence of minimal medium with lactate as a single carbon source. This was a verification that the gene was coded for a functional pyruvate-carboxylase.

Furthermore, the plasmid pEK0pyc was transformed in the *C. glutamicum* wild type ATCC 13032 by electroporation. The resulting strain WT (pEK0pyc) was investigated by comparison to the

- 14 -

wild type ATCC 13032 with respect to its pyruvate-carboxylase activity. The strain was cultured in a complex medium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) with 0.5% lactate and on minimal medium with 2% lactate or 4% glucose and the pyruvate-carboxylase test was carried out corresponding to the method as described by Peters-Wendisch et al (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). The results of the analysis (Table 1) showed that the pyruvate-carboxylase activity in the pEK0-pyc-carrying strain was about 4 times higher than in the starting strain.

4. Increased Accumulation of Lysine by Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase Gene in the Strain *C. glutamicum* DG 52-5.

To investigate the effect of the overexpression of the gene for the pyruvate-carboxylase in the lysine-producing strain DG 52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229), the expression vector pVWEX1 is used to promote an IPTG-inducible expression. In this vector, the pyc gene was promotorlessly cloned. For that purpose, initially PCT-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 to 355 in the nucleotide sequence according to SEQ ID No. 1), is synthesized and 261 bp of the promotorless starting region of the pyruvate-carboxylase gene was amplified by means of PCR. The primer was so selected that Primer 1 enabled a PstI cleavage site and Primer 2 a BamHI cleavage site. After the PCR, the 274 bp PCR product was isolated, ligated to concatemers and then cleaved with the restriction enzymes PstI and BamHI. The

- 15 -

restriction product was concentrated by ethanol precipitation and then ligated with the PstI-BamHI cleaved vector pVWEX1. The resulting construct pVWEX1-PCR was tested by restriction. The end region of the pyc gene was isolated by RcaI-Klenow-SalI treatment from the vector pEK0pyc and ligated in the BamHI-Klenow-SalI during vector pVWEX1-PCR. The resulting construct pVWEX1pyc was analyzed by restriction mapping. Physical mapping of the plasmid is shown in FIG. 2.

The plasmid was introduced by electroporation in the *C. glutamicum* strain DG 52-5. As a control, the strain DG 52-5 was transformed with the vector pVWEX1 without insert and the L-lysine precipitation of three different transformands were compared. For this purpose (DG 52-5 (pVWEX1pyc) 3,4 and (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press with 50 μ g/I kanamycin) and the respective fermentation medium in each case from the preculture was separately inoculated. The medium contained additional kanamycin to maintain the plasmid stable. In each case two parallel tests were run whereby one flask of 200 μ g IPTG/ml was added while the second flask contained no IPTG. After cultivation for 48 hours at 30°C on a rotation shaker at 120 RPM, the accumulated lysine quantity in the medium was determined. The determination of the amino acid concentration was effected by means of high-pressure liquid chromatography (J Chromat 1983, 266: 471-482).

The results of the fermentation are shown in Table 2 whereby the values given are mean values each from three

- 16 -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

experiments with different clones. It shows that the overexpression of the pyruvate-carboxylase gene results in a 50% increased accumulation of lysine in the medium. Thus the use of the covered and described gene for the anapleurotic enzyme pyruvate-carboxylase enables a process of lysine formation to be significantly improved.

5. Increased Accumulation of Threonine and Homoserine by Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase Gene in the Strain *C. glutamicum* DM 368-3

Analogously to the experiment in L-lysine formation, the accumulation of threonine in the culture supernatant by overexpression of the gene for pyruvate-carboxylase was also investigated for this purpose, as has been described under point 4, the threonine production strain *C. glutamicum* DM 368-3 (Degussa AG) was transformed with the plasmid pVWEX1pyc with control by the plasmid pVWEX1 and the threonine separation was investigated with each of three different transformands. For this purpose DM 368-3 (pVWEX1) 2 and 3 and DM 368-3 (pVWEX1pyc) 1, 2 and 3 in complex medium (2xTY with 50 µg/l kanamycin) were cultured and the fermentation medium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) in each case was separately inoculated from the preculture. The medium contained additional kanamycin to hold the plasmid stable. Two parallel sets of tests were carried out whereby 200 µg IPTG/ml was added to one flask while the second flask contained no IPTG. After culturing for 48 hours at 30°C on a rotation shaker at 120

RPM, the threonine quantities accumulated in the medium were determined. The determination of the amino acid concentration was effected also by means of high-pressure liquid chromatography (J Chromat 1983, 266: 471-482). The results of the fermentation are shown in Table 3 whereby the values given are mean values from each of three experiments with different clones. It shows that the overexpression of the pyruvate-carboxylase gene gave about a 40% increase in the threonine concentration in the medium. The use of the covered and described gene for anapleurotic enzyme pyruvate-carboxylase in a process for L-threonine formation significantly improves the latter.

Furthermore, the amino acid concentration determination shows surprisingly that the strain with the overexpressed pyruvate-carboxylase gene also yields 150% more homoserine in the medium than the strain with the nonoverexpressed gene. Corresponding results are shown in Table 3. They make clear that in the process according to the invention the threonine ^{yield} like the homoserine ^{yield} can be significantly improved. X

6. Increased Accumulation of Glutamate by Overexpression of the Pyruvate-Carboxylase Gene in *C. glutamicum* Wild Type

Analogous to the experiments for L-lysine, L-threonine and L-homoserine formation (see above, the 4. and 5.), accumulation of glutamate in the culture supernatant, overexpression of the gene for pyruvate-carboxylase was also investigated. For this purpose, as described, the point 4 wild type *C. glutamicum* ATCC 13032 with

- 17 -

- 18 -

the plasmid pVWEX1 pyc was transformed in addition to the control with the plasmid pVWEX1 and the glutamate separation determined from each of two different transformands. Thus *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) D1 and D2 as well as *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1 pyc) 1 and 2 were cultured in the complex medium (2xTY with 50 µg/l kanamycin) and the fermentation medium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) in each case was separately inoculated from the preculture period. The medium contained additional kanamycin to stabilize the plasmid. To induce glutamate separation, 25 mg Tween 60 was added per ml to the medium about 6 hours after the inoculation. Two parallel sets of tests were carried out whereby in one, 200 µg IPTG/ml is added to the flask while the second flask contained no IPTG. After culturing for 48 hours at 30°C on a rotation shaker at 120 RPM, the glutamate quantity accumulated in the medium was determined. The determination of the amino acid concentration was effected also by means of high-pressure liquid chromatography (J Chromat 1983, 266: 471-482). The results of the fermentation are shown in Table 4 whereby values given are averages with each two experiments with different clones. It shows that the overexpression of the pyruvate-carboxylase gene gave rise to up to 500% increase of the glutamate concentration in the medium. The use of the covered and described gene for the anapleurotic enzyme pyruvate-carboxylase improved the glutamate formation significantly.

Strain	IPTG [µg/ml]	Pyruvate Carboxylase [nmol min ⁻¹ mg Dry Weight ⁻¹]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

Table 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

21437

Strain	IPTG [µg/ml]	Lysine [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

Table 2

- 21 -

21437

Strain	IPTG [µg/ml]	Threonine [mM]	Homoserine [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,9 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

Table 3

- 22 -

21437

Strain	IPTG [µg/ml]	Glutamate [mM]
ATCC 13032	200	11 ± 2
ATCC 13032	0	13 ± 2
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	200	67 ± 4
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	0	32 ± 4

Table 4

- 23 -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/529043

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 11 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06210	International filing date (day/month/year) 30 September 1998 (30.09.98)	Priority date (day/month/year) 04 October 1997 (04.10.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P13/20, 1/15)		
Applicant FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>21</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 24 April 1999 (24.04.99)	Date of completion of this report 15 October 2000 (15.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06210

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☒ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-3,5-17, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages 4,4a,18-29, filed with the letter of 01 October 1999 (01.10.1999),
pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-37, filed with the letter of 01 October 1999 (01.10.1999),
Nos. _____, filed with the letter of _____

☒ the drawings, sheets/fig 1/2, 2/2, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☒ the description, pages 25-28, as well as the initially filed not numbered sequence listing

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06210

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box II.3.

The International Preliminary Examining Authority is not in possession of the priority documents pertaining to the present application . This international preliminary examination report is therefore based on the assumption that the priority of all the claimed subjects is valid. If this were not the case, it should be noted that the documents designated as P and X documents in the international search report could become relevant to the assessment of novelty and inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 98/06210

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-37	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-37	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-37	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following document:

D1: Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 47, 1997,
S.M. Park et al, 'Elucidation of anaplerotic
pathways in *Corynebacterium glutamicum* via
¹³C-NMR spectroscopy and GC-MS'.

2. D1 (closest prior art) describes the presence of
pyruvate carboxylase in lysin-overproducing
Corynebacteria. The enzyme serves, *inter alia*, to
synthesise oxalacetate at the switching point
between the energy preparation (citric acid cycle)
and the biosynthesis of, for example, amino acids.

It cannot, however, be deduced clearly from D1 that
an increase in the pyruvate carboxylase and
therefore increased production of oxalacetate would
at the same time inevitably lead to an increase in
the production of amino acids of the aspartate
and/or glutamate family.

The subject matter of the present application
describes a method for the microbial production of
amino acids of the aspartate and/or glutamate family

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

by increasing pyruvate carboxylase activity. The prior art neither discloses nor clearly suggests corresponding methods (see above). The requirements of PCT Article 33(2) and (3) are therefore satisfied. The scope of the claims is also justified for these reasons.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

21437

PCT**ANTRAG**

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PCT/EP 98 / 06210

Internationales Aktenzeichen

30 SEP 1998**(30 09. 1998)**

Internationales Anmeldedatum

EUROPEAN PATENT OFFICE

PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) **P 11 PCT****Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG**

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Forschungszentrum Jülich GmbH
Postfach 1913
D-52425 Jülich
Deutschland

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:
(02461) 61-3004

Telefaxnr.:
(02461) 61-2860

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Eikmanns, Bernd
Gleißelstetten 49
D-89081 Ulm
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.
Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒

Anwalt

☐

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Pielken, Petra
Becker-Gundahl-Str. 36
D-81479 München
Deutschland

Telefonnr.:
(089) 74997953

Telefaxnr.:
(089) 74997953

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Peters-Wendisch, Petra
Steinenkamp 1
D-51496 Bergisch-Gladbach
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Sahm, Hermann
Wendelinusstr. 71
D-52428 Jülich
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | | |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LV Lettland | |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau | |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MN Mongolei | |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MW Malawi | |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko | |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> NO Norwegen | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland | |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> PL Polen | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> PT Portugal | |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> RO Rumänien | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation | |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> SD Sudan | |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> SE Schweden | |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SG Singapur | |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SI Slowenien | |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei | |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone | |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan | |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan | |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TR Türkei | |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago | |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine | |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda | |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan | |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> VN Vietnam | |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien | |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LT Litauen | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LU Luxemburg | <input type="checkbox"/> | |

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCHWeitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	4. Oktober 1997 (4.10.1997)	197 43 894.6	
(2) DE	14. Juli 1998 (14.07.1998)	198 31 609.7	
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☐ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____
bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA /

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 4 Blätter
 2. Beschreibung : 29 Blätter
 3. Ansprüche : 7 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 2 Blätter

Insgesamt 43 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☒ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☒ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☒ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung Nr. 2 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Petra Pielken

München, den 29.09.1998

Dr. Petra Pielken

- Patentanwältin -

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:		Vom Anmeldeamt auszufüllen 30 SEP 1998 (30.09.98)		2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:				
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:				
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /		6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben		

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Vom Internationalen Büro auszufüllen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18228 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE 198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 20. Mai 1999 (20.05.99)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANN, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PETERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).			
(74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).			

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

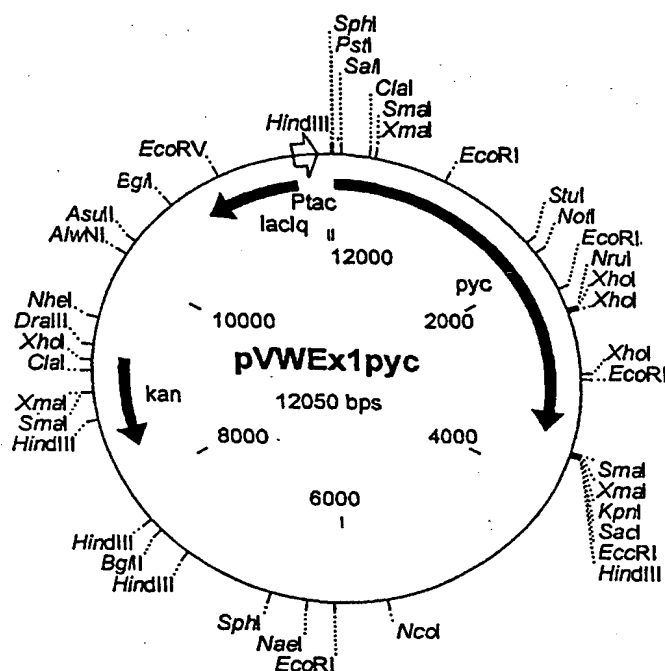
(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Türkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Bénin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C12P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Microbiology, Vol. 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", page 915 - page 927, see the whole article	1-37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DBJ, Accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 February 1998, page 20-109, 165-3587	18-25
X	Appl Microbiol Biotechnol; Vol. 47, 1997; S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", page 430 - page 440, see the whole article, in particular page 431, column 2, lines 7-18	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 1999 (17.02.99)

Date of mailing of the international search report

09 March 1999 (09.03.99)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Microbiology, Vol. 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate Carboxylase as an Anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamic- um", page 1095 - page 1103, see the abstract and the discussion	1-37
A	Chemical Abstracts, Vol. 126, Nr 12, 24 March 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenol- pyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid produc- tion", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. july 1996, 1-121	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, Nr 2, February 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequen- ces for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Coryne- bacterium glutamicum", page 429 - page 436, see abstract; page 433, column 2, lines 6-32	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 July 1996 (24.07.96), see abstract	1-37
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

02/02/99

International application No.
PCT/EP 98/06210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P, C12N

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Microbiology, Band 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", Seite 915 - Seite 927, Siehe den ganzen Artikel	1-37
	--	
P,X	EMBL, Databas Genbank/DBDJ, accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 Feb 1998, nt 20-109, 165-3587	18-25
	--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachman naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17 Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09.03.99

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenberichterstattung

Bevollmächtigter Bediensteter



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

HAMPUS RYSTEDT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", Seite 430 - Seite 440, Siehe den ganzen Artikel, besonders Seite 431, Spalte 2, Zeilen 7-18 --	1-37
A	Microbiology, Band 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamicum", Seite 1095 - Seite 1103, Siehe die Zusammenfassung und die Diskussion --	1-37
A	Chemical Abstracts, Band 126, Nr 12, 24 März 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. Juelich 1996, 1-121 --	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Band 62, Nr 2, Februar 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", Seite 429 - Seite 436, Siehe die Zusammenfassung; Seite 433, Spalte 2, Zeilen 6-32 --	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 Juli 1996 (24.07.96), Siehe die Zusammenfassung --	1-37

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144 ----- -----	18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören
02/02/99

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96

21432
**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Pielken, Petra
Becker-Gundahl-Str. 36
D-81479 München
ALLEMAGNE

EINGANG 16. OKT. 1999

PCT

**MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS**
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

15. 10. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
P 11 PCT

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP98/06210

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
30/09/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
04/10/1997

Anmelder

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

DA ROCHA, O.

Tel. +49 89 2399-8101



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 11 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06210	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 30/09/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/10/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P13/20		
Anmelder FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH et al.		

1. Di ser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 21 Blätter.

3. Di ser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 24/04/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.10.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter G. Willière Tel. Nr. +49 89 2399 8548 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06210

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-3,5-17	ursprüngliche Fassung			
4,4a,18-29	eingegangen am	05/10/1999	mit Schreiben vom	01/10/1999

Patentansprüche, Nr.:

1-37	eingegangen am	05/10/1999	mit Schreiben vom	01/10/1999
------	----------------	------------	-------------------	------------

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2	ursprüngliche Fassung
---------	-----------------------

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- | | | |
|---|---------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Beschreibung, | Seiten: | 25-28, sowie der ursprünglich nicht numerierten Sequenzprotokolle |
| <input type="checkbox"/> Ansprüche, | Nr.: | |
| <input type="checkbox"/> Zeichnungen, | Blatt: | |

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
 - ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06210

Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-37 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-37 Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-37 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

Zu Punkt II

Die der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Prioritätsunterlagen stehen der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde zur Zeit nicht zur Verfügung. Es wird daher bei dem vorliegenden internationalen vorläufigen Prüfungsbericht davon ausgegangen, dass alle beanspruchten Gegenstände prioritätsgestützt sind. Im anderen Falle wird darauf hingewiesen, dass die im internationalen Recherchenbericht genannten Dokumente der P,X Kategorie bezüglich der Beurteilung der Neuheit und der erfinderischen Tätigkeit relevant werden könnten.

Zu Punkt V

1. Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, 'Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via ^{13}C -NMR spectroscopy and GC-MS'

2. D1 (nächstliegender Stand der Technik) beschreibt die Gegenwart vom Pyruvat-Carboxylase in Lysin-überproduzierenden *Corynebakterien*. Das Enzym dient u.a. zur Synthese von Oxalacetat, welches an der Schaltstelle zwischen Energiebereitstellung (Zitronensäurezyklus) und der Biosynthese von z.B. Aminosäuren steht.

Es kann jedoch nicht eindeutig aus D1 geschlossen werden, dass eine Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase und damit verbunden eine erhöhte Produktion an Oxalacetat gleichzeitig und unweigerlich eine Erhöhung der Produktion von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie bewirken.

Der vorliegende Anmeldungsgegenstand beschreibt ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie durch Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität. Entsprechende Verfahren sind aus den Stand der Technik nicht bekannt und sind aus diesem auch nicht

eindeutig ableitbar (siehe oben). Die Erfordernisse des Artikels 33(2) und (3) PCT sind somit erfüllt. Die Breite der Ansprüche ist aus diesen Gründen auch gerechtfertigt.

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in *Corynebacterium* mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Das Vorkommen einer Pyruvat-Carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* wurde auch von einer weiteren Arbeitsgruppe mittels ^{13}C -NMR Spektroskopie und GS-MS nachgewiesen bzw. bestätigt (Park et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997, 47: 430-440). Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich,

4a

daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins
5 Kulturmedium ausscheiden. Es zeigte sich weiterhin, daß überraschenderweise auch die Glutamatproduktion signifikant erhöht ist (vgl. insbesondere Ausführungsbeispiel unter 6. und Tabelle 4).

Stamm	IPTG [$\mu\text{g/ml}$]	Pyruvat-Carboxylase [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg Trockengewicht}^{-1}$]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

Tabelle 1

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

Tabelle 2

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

Tabelle 3

Stamm	IPTG [µg/ml]	Glutamat [mM]
ATCC 13032	200	11 ± 2
ATCC 13032	0	13 ± 2
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	200	67 ± 4
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	0	32 ± 4

Tabelle 4

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Postfach 1913
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA	60
AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG	120
CTATCACCTT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTCTG ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCCTGAAG	300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT	360
CACCACTCAA GGCCTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCCAGGAGT	480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCAGAG GGTCTTGAT CTCAACGGTG	540
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTG GCGGAATCCA	600
CCCCGAGCAA AACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT	660
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG	720
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG	780
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG	840
ATCAGACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCAGTGCAG CGTCGTCACC	900
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT	960
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT	1020
TCTTGGTCTGA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG	1080
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG	1140
CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG	1200
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG	1260
GAAGTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC	1320
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG	1380
GTTCCGACTT TGAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT	1440
CTGGTGTGTC AACCAACATT GGTTTCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT	1500
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCAGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG	1560
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAAGCCTC	1620
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC	1680
TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC	1740
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAAGTATAC CACCTTCCGC GATGCACACC	1800
AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTG	1860
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG	1920
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC	1980
CGAATGTAAA CATTAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCGTACC	2040
CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTTAAGG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC	2100

GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAAICGAU GCAGTCCTGG	2160
AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA	2220
ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG	2280
GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA	2340
AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCAGACA	2400
CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG	2460
ACGGTGCTTC CGCACCCTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG	2520
CTGCATTTCG GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG	2580
AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC	2640
CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC	2700
AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG	2760
TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC	2820
TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA	2880
AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCTCCAG	2940
GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC	3000
CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC	3060
GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC	3120
GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG	3180
AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG	3240
ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TGCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC	3300
AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTCACCGCA ACCGCAGAAA	3360
AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA	3420
CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAGT CGCAATCATC GAGGCTATGA	3480
AGATGGAAGC AACAATCACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG	3540
CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGCGACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA	3600
AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT	3660
GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG	3720

GCTCAAAG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
 1 5 10 15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
 20 25 30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
 35 40 45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
 50 55 60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
 65 70 75 80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
 85 90 95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
 100 105 110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
 115 120 125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
 130 135 140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
 145 150 155 160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
 165 170 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
 180 185 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

195 200 205
 Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu
 210 215 220
 Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser
 225 230 235 240
 Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His
 245 250 255
 Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe
 260 265 270
 Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val
 275 280 285
 Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln
 290 295 300
 Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys
 305 310 315 320
 Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu
 325 330 335
 Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile
 340 345 350
 Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile
 355 360 365
 Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala
 370 375 380
 Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val
 385 390 395 400
 Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala
 405 410 415
 Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile
 420 425 430
 Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg
 435 440 445
 Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro
 450 455 460
 Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val
 465 470 475 480
 Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro

485

490

495

Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser
500 505 510

Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu
515 520 525

Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala
530 535 540

His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro
545 550 555 560

Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Lys Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu
565 570 575

Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu
580 585 590

Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val
595 600 605

Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro
610 615 620

Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser
625 630 635 640

Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln
645 650 655

Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala
660 665 670

Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys
675 680 685

Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys
690 695 700

Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg
705 710 715 720

Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp
725 730 735

Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala
740 745 750

Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala
755 760 765

Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile

770 775 780
 Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu
 785 790 795 800
 Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr
 805 810 815
 Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg
 820 825 830
 His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr
 835 840 845
 Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala
 850 855 860
 Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser
 865 870 875 880
 Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp
 885 890 895
 Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser
 900 905 910
 Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp
 915 920 925
 Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys
 930 935 940
 Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala
 945 950 955 960
 Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro
 965 970 975
 Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr
 980 985 990
 Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg
 995 1000 1005
 Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg
 1010 1015 1020
 Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val
 1025 1030 1035 1040
 Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser
 1045 1050 1055
 Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys

1060

1065

1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala
 1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala
 1090 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp
 1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile
 1125 1130 1135

Val Val Val Ser
 1140

5 Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
10
2. Verfahren nach Anspruch 1,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-
Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus
mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß ein Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* mit dem das Gen
enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die
an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme
dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die
entsprechende Aminosäure aufweisen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen
erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure
beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein
zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyn-
theseweg mit verminderter Aktivität abläuft.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der
Gattung *Corynebacterium* isoliert wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht
wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
gekennzeichnet durch
25 dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID
30 No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen
gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
- 10 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von
Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.
- 15 18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2
angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen
kodierenden Nukleotidsequenz.
- 20 19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von
Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen
gleichwirkenden DNA-Sequenz.
- 25 20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem
vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109
gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-
Sequenz.
- 30 21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem
tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor zugeordneten regulatorischen Sequenzen.

5

23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem zugeordnete regulatorische Gensequenzen.

10

24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23.

25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.

15

26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.

20

27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 25.

28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.

25

29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,

daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.

30

30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der

Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden Aminosäuren von Mikroorganismen.

33. Verwendung nach Anspruch 32,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.

34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert wird.

35. Verwendung nach Anspruch 34,

dadurch gekennzeichnet,

daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.

5

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,

dadurch gekennzeichnet,

daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus *Corynebacterium* verwendet wird.

10

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus *Corynebacterium* verwendet wird.

15

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 13/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18228 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE 198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANN, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PE- TERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). (74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

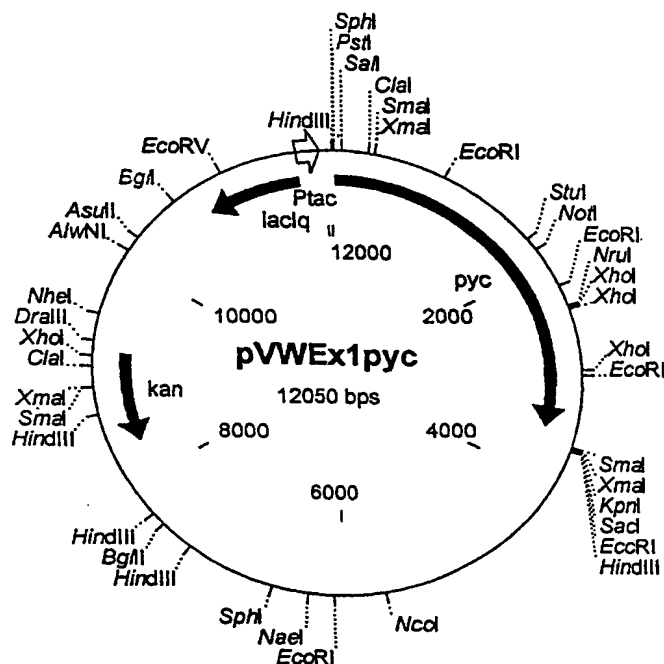
(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY
AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER
GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

5

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Anspruch 18 bis 23, Genstrukturen nach Anspruch 24, Vektoren nach Anspruch 25, transformierte Zellen nach Anspruch 26 bis 31 sowie

15 Verwendungen nach Anspruch 32 bis 37.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist. So wird z.B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-

20 Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die

25 biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. *Corynebacterium glutamicum* und seine Verwandten *ssp. flavum* und *ssp. lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 bis 260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

30

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese

der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte
Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0
5 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine
verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels.
So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der
10 Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-
Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter
Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 333 145), wohingegen die Erhöhung der
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu erhöhter
15 Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß
der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z.B.
Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen
20 Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese
sogenannten anaplerotischen Funktionen in *Corynebacterium* die
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, *Biology of industrial
micro-organisms* 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company,
London; Liebl, *The prokaryotes II*, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.;
25 Vallino und Stephanopoulos, *Biotechnol Bioeng* 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde
jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im
Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich
wuchsen (Peters-Wendisch et al., *FEMS Microbiology Letters* 1993, 112: 269 bis
274; Gubler et al., *Appl Microbiol Biotechnol* 1994, 40: 857 bis 863). Dieses

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in *Corynebacterium* mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

20

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden. Es zeigte sich weiterhin, daß überraschenderweise auch die Glutamatproduktion signifikant erhöht ist (vgl. insbesondere Ausführungsbeispiel unter 6. und Tabelle 4).

30

- Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch Mutation des endogenen Gens. Derartige
- 5 Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).
- 10 Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die
- 15 Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gens zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Desweiteren kann ggf durch Mutation
- 20 einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. „enhancer“ zugeordnet sein, die über eine verbesserte
- 25 Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-Gens in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert und in einen Aminosäureproduzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium* oder in *Escherichia coli* oder *Serratia marcescens*, transformiert. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* oder *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z.B. Simon et al., *Bio/Technology* 1983, 1: 784 bis 791; Eikmanns et al., *Gene* 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al., *FEMS Microbiology Letters* 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation (Schäfer et al., *J Bacteriol* 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche Stämme bevorzugt, die einen erhöhten Anteil an solchen Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und / oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für Konkurrenzreaktionen zuständig sind; d.h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure- β -Methylester (AME) resistenter coryneformer Mikroorganismen-Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614).

Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren
5 Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Desweiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw.
10 gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

15

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

20 Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der tac-Promotor (lacI^Q -Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.

Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind.

25 Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

Ausführungsbeispiel

5 1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(pyc-)Genen, von *Saccharomyces cerevisiae* (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochim Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), *Aedes aegypti* (EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530) sowie von *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des pyc-Gens von *M. tuberculosis*. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homologe Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032, die wie bei Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

25

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus *C. glutamicum* wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

pyc 1	5'-	CGTCTTCATCGAAATGAAC -3'
pyc 2	5'-	ACGGTGGTGATCCGGCACT -3'

30

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus *C. glutamicum* verwendet. Die Primer wurden in
5 eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und Digoxigenin-markierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde
10 dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von *C. glutamicum* WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, SalI, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen
15 Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz)
20 transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb SalI-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment.

25

Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* im Cosmid pH79 verwendet, die das Genom von *C. glutamicum* zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der

30

CaCl₂-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro
5 LB-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten auf Nytran N13-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauffolgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl.
10 Nach Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3
15 Transformanten identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanten wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pH79-10, das ein 40 kb
20 Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen Sall und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 6,5 kb Sall- und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den E.
25 coli-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment, das 1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb ClaI-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment überlappte, durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend
10 restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576
15 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz mit der EMBL Gen-Datenbank (Heidelberg) ergab Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%) wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter
20 Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis 65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol
25 Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* trägt. Die Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No.1 und die entsprechende Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* wurde das Gen aus dem Plasmid pUCpyc als 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment in den *E. coli*-*C. Glutamicum*-Pendelvektor pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden
10 aufgefüllt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pEK0pyc wurde zunächst in den Stamm *E. coli* DH5 α transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanten isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch
15 Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen *C. glutamicum* Stammes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger
20 Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *C. glutamicum* komplementiert werden, d.h. der Stamm, der das Plasmid pEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat
25 als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pEK0pyc in den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pEK0pyc)

wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5 % Lactat und auf Minimalmedium mit 2 % Lactat bzw. 4 % Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pEK0-pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkaternen ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt

pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch RcaI-Klenow-SalI-Behandlung aus dem Vektor pEK0pyc isoliert und in
5 den BamHI-Klenow-SalI behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Figur 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den *C. glutamicum* Stamm DG52-5
10 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanten verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press; mit 50 µg/l
15 Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48
20 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen
25 Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50 % gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

**5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch
Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum*
DM368-3**

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm *C. glutamicum* DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanden untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40%igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Desweiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausschied als der Stamm mit nicht überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

6. Gesteigerte Akkumulation von Glutamat durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase im Wildtyp von *C. glutamicum*

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-, L-Threonin- und L-Homoserin-Bildung (siehe oben unter 4. und 5.) wurde auch die Akkumulation von Glutamat im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Glutamatausscheidung von jeweils zwei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) D1 und D2 sowie *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) 1 und 2 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurde dem Medium ca. 6 Stunden nach dem Inokulieren 25 mg Tween 60 pro ml zugesetzt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Glutamatmenge bestimmt. Die Bestimmung der

Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der
5 Fermentation ist in Tabelle 4 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils zwei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer bis zu 500%igen Steigerung der Glutamatkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-
10 Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Glutamatbildung entscheidend zu verbessern.

Stamm	IPTG [$\mu\text{g/ml}$]	Pyruvat-Carboxylase [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg Trockengewicht}^{-1}$]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

Tabelle 1

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

Tabelle 2

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

Tabelle 3

Stamm	IPTG [µg/ml]	Glutamat [mM]
ATCC 13032	200	11 ± 2
ATCC 13032	0	13 ± 2
ATCC 13032(pVWEX1- <i>pyc</i>)	200	67 ± 4
ATCC 13032(pVWEX1- <i>pyc</i>)	0	32 ± 4

Tabelle 4

5 P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat-
und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch
10 genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-
Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden
Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym
mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der
Genkopienzahl erhöht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein
Genkonstrukt eingebaut wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein
zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyn-
theseweg mit verminderter Aktivität abläuft.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der
Gattung Corynebacterium isoliert wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht
wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
gekennzeichnet durch
25 dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID
30 No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

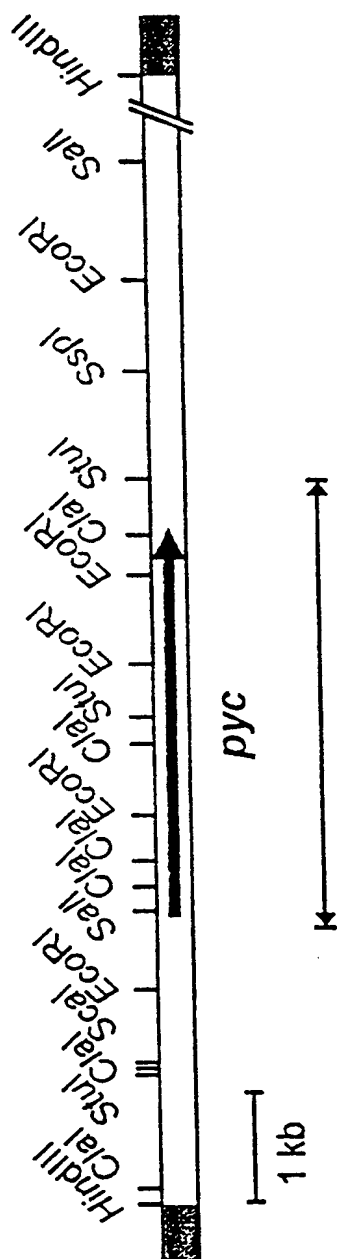
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von
 Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen
 gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
- 10 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von
 Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.
18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2
15 angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen
 kodierenden Nukleotidsequenz.
19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von
 Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen
20 gleichwirkenden DNA-Sequenz.
20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem
 vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109
 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-
25 Sequenz.
21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem
 tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor
zugeordneten regulatorischen Sequenzen.
- 5
23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem
zugeordnete regulatorische Gensequenzen.
24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der
10 Ansprüche 18 bis 23.
25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche
18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
- 15
26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-
Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur
nach Anspruch 24.
27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach
20 Anspruch 25.
28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
- 25
29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten
Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure
30 beteiligten Enzyme dereguliert sind.

30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden
Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der
entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten
enthält.
32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der
15 Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden
Aminosäuren von Mikroorganismen.
33. Verwendung nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter
Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.
34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit
einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert
wird.

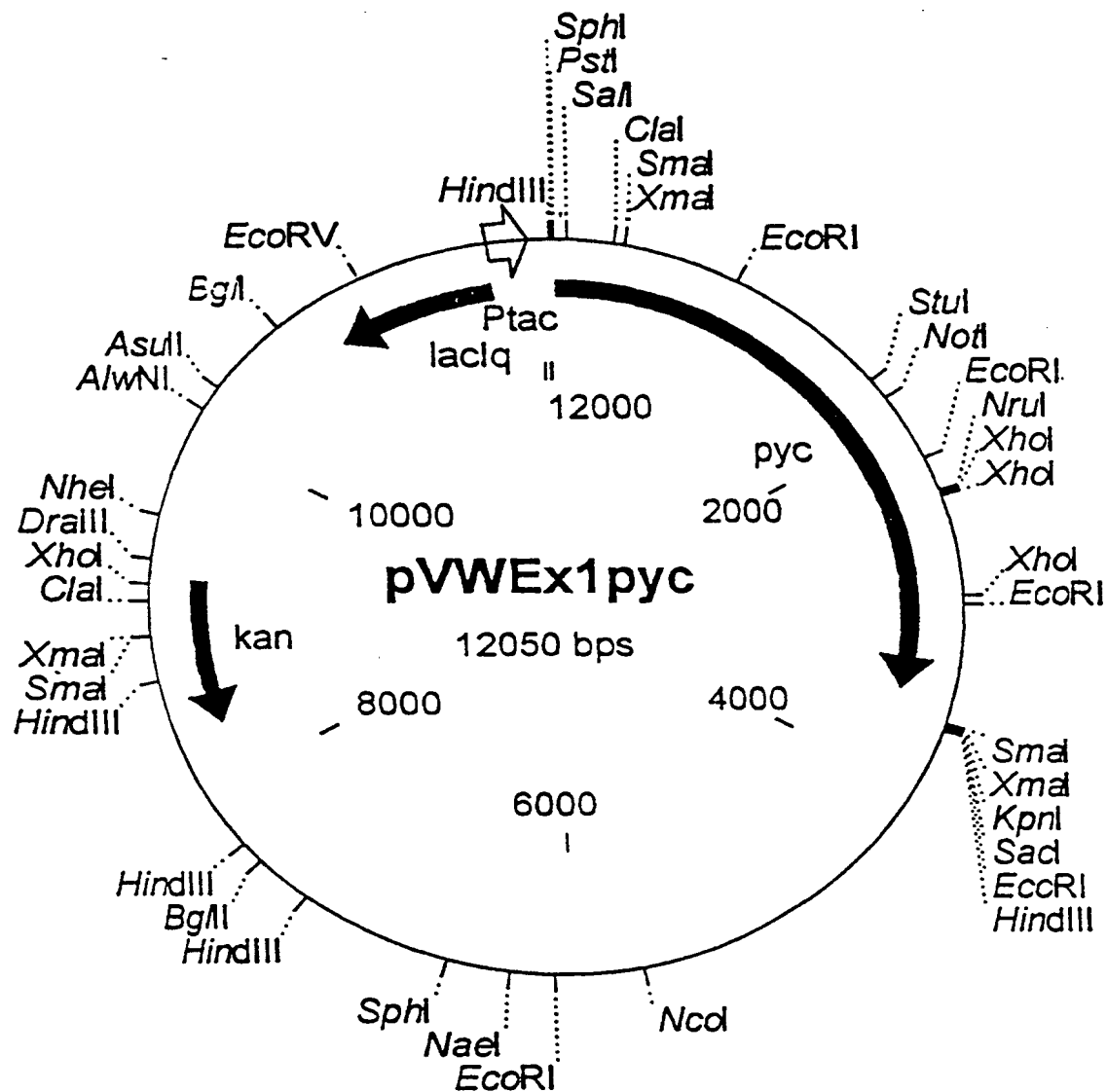
35. Verwendung nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus Corynebacterium verwendet wird.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus Corynebacterium
verwendet wird.

1/2



Figur 1

2/2



Figur 2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Postfach 1913
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA	60
AACAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG	120
CTATCACCTC TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTG ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCGTGAAG	300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT	360
CACCAAGTCAA GGCCTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCCGCGAGT	480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCAGAG GGTTCCTTGAT CTCACCGGTG	540
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTTG GCGGAATCCA	600
CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT	660
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG	720
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG	780
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG	840
ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC	900
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT	960
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT	1020
TCTTGGTCGA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG	1080
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG	1140
CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG	1200
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG	1260
GAAGTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC	1320
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG	1380
GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT	1440
CTGGTGTTGC AACCAACATT GGTTCCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT	1500
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCAGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG	1560
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTACCGTG AACAGCCTC	1620
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGACAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC	1680
TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC	1740
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAAGTATAC CACCTTCCGC GATGCACACC	1800
AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTCG	1860
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG	1920
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC	1980
CGAATGTAAA CATTGAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC	2040
CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTAAAGG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC	2100

GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG	2160
AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA	2220
ATGAAAAGCT CTACACCCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG	2280
GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA	2340
AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCACGACA	2400
CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG	2460
ACGGTGCTTC CGCACCCTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG	2520
CTGCATTTCG GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG	2580
AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC	2640
CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC	2700
AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG	2760
TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC	2820
TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA	2880
AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCCTCCAG	2940
GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC	3000
CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC	3060
GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC	3120
GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG	3180
AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG	3240
ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TGCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC	3300
AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTCACCGCA ACCGCAGAAA	3360
AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA	3420
CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAGT CGCAATCATC GAGGCTATGA	3480
AGATGGAAGC AACAACTACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG	3540
CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGC GACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA	3600
AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT	3660
GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG	3720

GCTCAAAG

3728

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
1           5           10           15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
          20           25           30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
          35           40           45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
          50           55           60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
65           70           75           80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
          85           90           95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
          100          105          110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
          115          120          125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
          130          135          140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
145          150          155          160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
          165          170          175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
          180          185          190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

195	200	205
Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu 210 215 220		
Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser 225 230 235 240		
Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His 245 250 255		
Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe 260 265 270		
Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val 275 280 285		
Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln 290 295 300		
Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys 305 310 315 320		
Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu 325 330 335		
Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile 340 345 350		
Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile 355 360 365		
Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala 370 375 380		
Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val 385 390 395 400		
Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala 405 410 415		
Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile 420 425 430		
Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg 435 440 445		
Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro 450 455 460		
Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val 465 470 475 480		
Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

485										490					495				
Ile	Asp	Lys	Leu	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Arg	Gly	Ser				
			500						505				510						
Arg	Asp	Arg	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly	Pro	Ala	Ala	Phe	Ala	Arg	Asp	Leu				
			515				520					525							
Arg	Glu	Gln	Asp	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Phe	Arg	Asp	Ala				
	530					535					540								
His	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Val	Arg	Ser	Phe	Ala	Leu	Lys	Pro				
545					550					555					560				
Ala	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Lys	Thr	Pro	Glu	Leu	Leu	Ser	Val	Glu				
				565					570					575					
Ala	Trp	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Asp	Val	Ala	Met	Arg	Phe	Leu	Phe	Glu				
				580				585					590						
Asp	Pro	Trp	Asp	Arg	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Met	Pro	Asn	Val				
			595				600					605							
Asn	Ile	Gln	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Arg	Asn	Thr	Val	Gly	Tyr	Thr	Pro				
						615					620								
Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Cys	Arg	Ala	Phe	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser				
625					630						635				640				
Gly	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Ile	Phe	Asp	Ala	Leu	Asn	Asp	Val	Ser	Gln				
				645					650					655					
Met	Arg	Pro	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Glu	Thr	Asn	Thr	Ala	Val	Ala				
			660					665					670						
Glu	Val	Ala	Met	Ala	Tyr	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys				
			675				680					685							
Leu	Tyr	Thr	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Met	Ala	Glu	Glu	Ile	Val	Lys				
			690			695					700								
Ser	Gly	Ala	His	Ile	Leu	Ala	Ile	Lys	Asp	Met	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg				
705					710					715					720				
Pro	Ala	Ala	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Thr	Ala	Leu	Arg	Arg	Glu	Phe	Asp				
				725					730					735					
Leu	Pro	Val	His	Val	His	Thr	His	Asp	Thr	Ala	Gly	Gly	Gln	Leu	Ala				
			740					745					750						
Thr	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Val	Asp	Gly	Ala				
			755				760					765							
Ser	Ala	Pro	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Gln	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Ile				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

770	775	780
Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu 785 790 795 800		
Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr 805 810 815		
Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg 820 825 830		
His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr 835 840 845		
Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala 850 855 860		
Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser 865 870 875 880		
Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp 885 890 895		
Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser 900 905 910		
Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp 915 920 925		
Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys 930 935 940		
Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala 945 950 955 960		
Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro 965 970 975		
Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr 980 985 990		
Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg 995 1000 1005		
Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg 1010 1015 1020		
Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val 1025 1030 1035 1040		
Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser 1045 1050 1055		
Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1060	1065	1070
Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala 1075	1080	1085
Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala 1090	1095	1100
Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp 1105	1110	1115 1120
Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile 1125	1130	1135
Val Val Val Ser 1140		

SEQUENCE LISTING

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09/529043

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 11 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/06210	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 30/09/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/10/1997
Anmelder FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 2

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)
 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P, C12N

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Microbiology, Band 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", Seite 915 - Seite 927, Siehe den ganzen Artikel	1-37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DBDJ, accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 Feb 1998, nt 20-109, 165-3587	18-25

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von
Feld C zu entnehmen.

☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachman naheliegend ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchen- bericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17 Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09.03.99

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL-2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

HAMPUS RYSTEDT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", Seite 430 - Seite 440, Siehe den ganzen Artikel, besonders Seite 431, Spalte 2, Zeilen 7-18 --	1-37
A	Microbiology, Band 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamicum", Seite 1095 - Seite 1103, Siehe die Zusammenfassung und die Diskussion --	1-37
A	Chemical Abstracts, Band 126, Nr 12, 24 März 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. Juelich 1996, 1-121 --	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Band 62, Nr 2, Februar 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", Seite 429 - Seite 436, Siehe die Zusammenfassung; Seite 433, Spalte 2, Zeilen 6-32 --	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 Juli 1996 (24.07.96), Siehe die Zusammenfassung --	1-37

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144</p> <p>-- -----</p>	18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SA 212569

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/02/99

International application No.

PCT/EP 98/06210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96

THIS PAGE BLANK (USPTO)